

بسمه تعالی

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین



معاونت پژوهشی

فرم پیش نویس طرح پژوهشی

عنوان طرح: بررسی تاثیر همزمان ملاتونین، ال-کارتنن و آتورواستاتین بر میزان بروز آپوپتوز در اووسیت های کشت داده شده موش سوری در محیط آزمایشگاه (In vitro)

نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: پوریا سلیمانی

دانشکده/مرکز تحقیقاتی: مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین

الف-۱-۲ عنوان طرح به فارسی:

بررسی تاثیر همزمان ملاتونین+ ال-کارتنن و آتورواستاتین بر میزان بروز آپوپتوز در اووسیت های کشت داده شده موش سوری در محیط آزمایشگاه (In vitro)

ب-۱-۲ عنوان طرح به انگلیسی:

The effect of melatonin, L-carnitine and atorvastatin on mature mouse oocytes apoptosis by the method of in vitro

۲-۲ نوع طرح:

*Basic

Development

■ بنیادی

**Applied

□ کاربردی

Experimental

□ بنیادی- کاربردی

۲-۳ بیان مسأله و بررسی متون (در صورت نیاز از حداکثر ۲ صفحه اضافی استفاده و کد مراجع را پی در پی ذکر نمائید).

ناباروری به عنوان یک ناتوانی زن و شوهر پس از ۱۲ ماه مقاربت محافظت نشده تعریف می شود (۱). و یک بیماری شایع است که حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از همه ی زوج ها را تحت تاثیر قرار می دهد که اکثر آنها به دنبال تکنیک های کمک باروری می باشند (۲). فن آوری کمک باروری ART شامل تمام درمان هایی است که برای دستکاری تخم های انسانی و اسپرم انسان یا جنین ها برای ایجاد باروری مورد استفاده قرار میگیرد (۱). برخلاف تصور بسیاری از افراد ART موفقیت را تضمین نمی کند تقریباً ۵۰٪ از زوج هایی که IVF را شروع می کنند حتی اگر چندین دوره IVF انجام دهند، بدون فرزند باقی می مانند. عوامل مختلفی در پیش بینی حاملگی توسط IVF تاثیر دارد که یکی از آنها کیفیت تخمک و جنین است (۳). کیفیت خوب و بلوغ خوب تخمک پیش نیاز مهمی برای میزان بالای باروری و لانه گزینی در دوره ی IVF و ICSI می باشد (۴). در سال های اخیر توجه به تاثیر منفی استرس اکسیداتیو ناشی از اضافه شدن رادیکال های آزاد بر کیفیت تخمک طی دوره ی IVF شده است. رادیکال های آزاد گونه های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده در سیستم های زنده می باشند. یک عملکرد فیزیولوژیک که ROS نقش اساسی در آن ایفا می کند، فیزیولوژی تولید مثل از جمله رشد فولیکول، بلوغ تخمک، تخمک گذاری و آترزی فولیکولار می باشد (۵). تولید ROS در طی دستکاری تخمک ها در طول IVM و درون محیط کشت می تواند سبب آسیب های میتوکندری، بلوک رشد جنین، کمبود ATP و آپوپتوز شود (۶). رادیکال های آزاد نقش دو گانه با اثرات زیان آور و سودمند دارند رادیکال های آزاد فیزیولوژیکی تعادل سلولی را حفظ می کنند که با توجه به تولید و ظرفیت آنتی اکسیدان های سلول تعادل بازدارندگی نامیده می شود. این تعادل از طریق آنتی اکسیدان هایی مانند کاتالاز، گلوکاتایون پراکسیداز و برخی مولکول ها مانند ملاتونین انجام می شود (۵). ملاتونین و ال-کارنتین جزء آنتی اکسیدان های طبیعی و اندروژیک می باشند (۷). ملاتونین می تواند تولید رادیکال های آزاد و ROS را کاهش دهد و نیتروژن فعال (RNS) را مهار کند و از این طریق از تخمک ها در برابر استرس اکسیداتیو در طی بلوغ *In vitro* محافظت نماید (۶). مایع فولیکولی (FF) به دست آمده از فولیکول های انترال دارای غلظت ملاتونین بالاتری نسبت به یک نمونه ی پلاسما است که به طور همزمان جمع آوری می شود (۸). این احتمالاً مربوط به ضرورت حفاظت از تخمک در برابر رادیکال های آزاد تشکیل شده در هنگام بلوغ و حفظ کیفیت تخمک می باشد (۹). در طی IVF تخمک و جنین در معرض سطوح بالاتری از رادیکال های سوپراکساید آزاد که در جریان پروتکل تحریکی آغاز شده اند، قرار می گیرند. علاوه بر این سطوح ROS به دلیل سطوح بالای اکسیژن درون انکوباتور در سراسر پروسه ی IVF بالاتر است. مطالعات انجام شده نشان دادند که مکمل ملاتونین در محیط کشت اووسیت باعث کاهش قابل ملاحظه ای از ROS و نسبت بیشتری از تخمک های بالغ MII می شود (۵). همچنین DO Lt و همکاران نشان دادند که مکمل ملاتونین در محیط کشت در طی IVM تاثیر مثبتی بر رشد و کیفیت جنین ها دارد (۱۰). به نظر می رسد میتوکندری مهم ترین

محل تولید ROS می باشد. زنجیره ی حمل و نقل الکترونی میتوکندری با مولکول اکسیژن به طور مستقیم رادیکال های آنیونی پراکسید تشکیل می دهد. ملاتونین از طریق کاهش استرس اکسیداتیو میتوکندری سبب کاهش وقایع آپوپتوزی و مرگ سلولی می شود (۱۱). مطالعات نشان داده علاوه بر ملاتونین مکمل ال-کارنتین نیز از طریق افزایش فعالیت میتوکندری باعث افزایش تعداد تخمک های MII می شود. Dunning در سال ۲۰۱۱ به همراه همکارانش نشان دادند که با اضافه کردن ال-کارنتین، تخمک ها میزان بلوغ بالاتری و میزان باروری بیشتری را نشان دادند. Somfai و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند اووسیت ها در محیط کشت حاوی ۱،۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر ال-کارنتین، به طور معنی داری افزایش فعالیت میتوکندری، کاهش قطر چربی و کاهش میزان ROS را نسبت به گروه کنترل نشان می دهند (۱۲). همچنین ال-کارنتین با اثر آنتی اکسیدانی می تواند از غشاء میتوکندری و DNA علیه آسیب های ناشی از صورت های فعالی اکسیژن ROS محافظت نماید و به شدت مانع از آپوپتوز وابسته به میتوکندری شود (۱۳). آپوپتوز یک سری تغییرات مشخص و کنترل شده است که به صورت برگشت ناپذیر منجر به مرگ سلولی می شود (۱۴). یکی از شاخص های تشخیص آپوپتوز رنگ آمیزی TUNEL می باشد که با تشخیص قطعه قطعه شدن DNA حاصل از آپوپتوز به صورت گسترده استفاده می شود (۱۵).

آتورواستاتین دارویی از دسته ی استاتین ها (HMG-CoA reductase inhibitors) می باشد که به جهت کاهش میزان چربی خون در بیماران به کار گرفته می شود. مکانیسم اثر این دارو مهار آنزیم hydroxy3 methylglutaryl CoA reductase 3 (آنزیم کبدی موثر در تولید کلسترول) است (۱۶).

در مطالعات نشان داده شده آتورواستاتین از طریق مهار آنزیم NOX2 با استرس اکسیداتیو مقابله و به عنوان یک آنتی اکسیدانت در بدن ایفای نقش می کند (۱۷). در مطالعاتی دیگر نشان داده شد پس از مصرف آتورواستاتین، پارامترهای خونی ناشی از استرس اکسیداتیو مانند MDA در نمونه های خون بیماران به طور معنی داری کاهش می یابد. به علاوه کلسترول بالا خود یکی از عوامل استرس اکسیداتیو در بدن محسوب می شود که آتورواستاتین نقش موثری در کاهش آن ایفا می کند (۱۸، ۱۹).

همچنین در مطالعه ای دیگر برای بررسی اثر آتورواستاتین بر قدرت باروری جنس مذکر، تاثیر مصرف آتورواستاتین بر پارامترهای semen در ۱۰ گروه سگ نر نژاد بیگل برای مدت ۲ سال بررسی شد که تاثیر به سزا و قابل توجهی درافزایش تعداد اسپرم در هر نمونه، میزان حرکت اسپرم، و بهبود مورفولوژی اسپرم ها دیده شد (۲۰).

استفاده همزمان از آنتی اکسیدان هایی مانند ویتامین E، ویتامین C، گلوتاتیون و ... در مطالعات مختلف صورت پذیرفته است. در مطالعه صورت گرفته توسط Gitto و همکاران، اثرات سینرژیستی محافظتی ملاتونین و دیگر آنتی اکسیدان ها در پیشگیری از پراکسیداسیون لیپید ناشی از آهن مورد بررسی قرار گرفت (۲۱).

انتخاب محیط کشت و مکمل‌های مناسب، تأثیر زیادی بر رشد و عملکرد سلول‌های جنینی در محیط خارج از بدن دارد. تا به امروز سیستم‌های کشت متعددی در راستای ارتقای مطالعات ناباروری ابداع گردیده است (۲۲). هرچند که نتایج حمایت کننده از تولید سلول‌های زایای بدوی عملکردی در محیط *In vitro* گسترده نیست، اما این مطالعات نشان دهنده تلاش‌های در زمینه تولید و تشخیص این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه می باشد. با وجود تحقیقات انجام شده، انجام مطالعات گسترده تر جهت تشخیص شرایط صحیح کشت شامل مکمل های تغذیه ای مناسب کشت می تواند در تکامل سلول های زایا موثر باشد. در این مورد محیط کشت های مختلف همراه با مکمل و هورمون های متفاوت در جهت رشد، بلوغ و لقاح داخل آزمایشگاهی اووسیت در گونه های مختلف توسط محققین مورد بررسی قرار گرفته است (۲۳).

با توجه به اطلاعات ما محیط کشت مناسب که بتواند تخمک ها را در برابر آنتی اکسیدان ها محافظت نماید وجود ندارد و از این رو که ملاتونین، ال-کارنتین و آتورواستاتین جزء آنتی اکسیدان های خیلی قوی هستند لذا در تحقیق حاضر تاثیر همزمان ملاتونین، ال-کارنتین و آتورواستاتین را در میزان آپوپتوز اووسیت موش مورد بررسی قرار دادیم و در صدد هستیم به این سوال اساسی پاسخ دهیم که آیا ملاتونین، ال-کارنتین و آتورواستاتین می توانند بر آپوپتوز موثر باشند یا نه؟ و در صورت تایید اثرات مثبت بر روی اووسیت، ملاتونین، ال-کارنتین و آتورواستاتین می توانند به عنوان یک مکمل در محیط کشت تخمک در طی پروسه ی IVM مطرح شوند.